


Superparamagnetic particles, process for producing the same and their use**Publication number:** JP8508721T**Publication date:** 1996-09-17**Inventor:****Applicant:****Classification:**

- international: A61N1/40; A61K 9/50; A61K31/395; A61K31/66; A61K31/77; A61K 35/12; A61K35/74; A61K3 5/76; A61K38/43; A61K 39/395; A61K41/00; A61K 47/02; A61K49/00; A61K 49/18; A61N2/00; A61P35/ 00; A61P37/00; B03C1/01; C07F9/09; C07H21/00; C12N11/14; C12Q1/68; G01N33 /543; H01F1/00; H01F1/36; H01F1/44; G01R33/28; A61N1/40; A61K9/50; A61K31/395; A61K31/66; A61K31/74; A61K35/12; A61K35/66; A61K38/43; A61K39/395; A61K41/00; A61K47/02; A61K49/00; A61K49/06; A61N2/00; A61P35/00; A61P37/00; B03C1/005; C07F9/00; C07H21/00; C12N 11/00; C12Q1/68; G01N33/543; H01F1/00; H01F1/12; H01F1/44; G01R33/28; (IPC1-7): A61K31/395; A61K31/66; A61K31/77; A61K35/12; A61K35/74; A61K35/76; A61K38/43; A61K39/395; A61N1/40; A61N2/00; A61K47/02; A61K9/50; A61K49/00

- European: A61K9/50T; A61K41/00U; A61K49/18; B03C1/01; C07F9/09A1; C07H21/00C2; C12N11/14; C12Q1/68B 10; G01N33/543D4D; H01F1/00E10; H01F1/36; H01F1/44; H01F1/44P; Y01N6/00; Y01N12/00

Application number: JP19940520523T 19940317**Priority number(s):** WO1994DE00314 19940317; DE 19934309333 19930317; DE19944407338 19940302**Also published as:**


WO9421240 (A3)
WO9421240 (A2)
EP0689430 (A3)
EP0689430 (A2)
US5916539 (A1)

more >>

[Report a data error here](#)

Abstract not available for JP8508721T

Abstract of corresponding document: **US5916539**

PCT No. PCT/DE94/00314 Sec. 371 Date Sep. 12, 1995 Sec. 102(e) Date Sep. 12, 1995 PCT Filed Mar. 17, 1994 PCT Pub. No. WO94/21240 PCT Pub. Date Sep. 29, 1994 New superparamagnetic particles useful in medicine for destroying tumors, increasing immunity and diagnosing conditions are disclosed. For that purpose, very small superparamagnetic single -domain particles are aggregated and protected against further aggregation by chemical bonding of reactive stabilizer substances on the surface of the superparamagnetic particles. These new particles thus consist of stable, decomposable aggregates with a particle size in a range between 10 and 1000 nanometers and a defined behavior in a magnetic field. The aggregates consist of several small superparamagnetic single -domain particles of iron oxide, iron mixed oxide or iron, with a particle size in a range between 3 and 20 nanometers, bearing on their surface chemically bound organic substances from the group comprising the phosphate, diphosphate, polyphosphate, thiophosphate, phosphonate or group containing polyalkylene glycols, phosphate group containing nucleotides, their oligomers or polymers, as well as phosphate group containing carbohydrates, which may present further binding sites. Both the new disclosed superparamagnetic aggregates and reactive stabilizer substances may be active substances.

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平8-508721

(43) 公表日 平成8年(1996)9月17日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	
A 6 1 K 47/02		7433-4C	A 6 1 K 47/02	A
9/50		7329-4C	9/50	A
49/00		7431-4C	49/00	C
// A 6 1 K 31/395	ADU	9454-4C	31/395	ADU
31/66	ABA	8314-4C	31/66	ABA
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 48 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平6-520523
 (86) (22) 出願日 平成6年(1994)3月17日
 (85) 翻訳文提出日 平成7年(1995)9月16日
 (86) 国際出願番号 P C T / D E 9 4 / 0 0 3 1 4
 (87) 国際公開番号 W O 9 4 / 2 1 2 4 0
 (87) 国際公開日 平成6年(1994)9月29日
 (31) 優先権主張番号 P 4 3 0 9 3 3 3 . 7
 (32) 優先日 1993年3月17日
 (33) 優先権主張国 ドイツ (D E)
 (31) 優先権主張番号 P 4 4 0 7 3 3 8 . 0
 (32) 優先日 1994年3月2日
 (33) 優先権主張国 ドイツ (D E)

(71) 出願人 シリカゲル ゲス. エム. ビー. エイチ
 ドイツ国、ベルリン ディー—14050、ア
 オルナレ 36
 (71) 出願人 ビルグリム, ハーバート
 ドイツ国、ベルリン ディー—14169、ソ
 フィー—シャルロット—ストラッセ 27 a
 (72) 発明者 ビルグリム, ハーバート
 ドイツ国、ベルリン ディー—14169、ソ
 フィー—シャルロット—ストラッセ 27 a
 (74) 代理人 弁理士 三宅 正夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 超常磁性粒子、その製法及びその用途

(57) 【要約】

腫瘍の破壊、免疫の増強及び診断の医薬に有用な新規な超常磁性粒子。非常に小さい超常磁性単一ドメイン粒子が凝集されて超常磁性粒子を形成し、その表面に反応性安定剤物質を化学的に結合させることによって更なる凝集を防いでいる。この超常磁性粒子は、磁界中で定められた行動をする粒径10ないし1000nmの安定で分解可能な凝集体からなる。凝集体は、鉄酸化物、鉄混合酸化物、鉄の粒径3ないし20の小さな超常磁性単一、ドメイン粒子からなり、その表面に、ホスフェイト、ジホスフェイト、ポリホスフェイト、チオホスフェイト、ホスホネート基含有ポリアルキレングリコール、ホスフェイト基含有ヌクレオチド、そのオリゴマーまたはポリマー、さらなる結合部位を提供するホスフェイト基含有カルボヒドレートを包含する群から選んだ化学的に結合した有機物質を有している。新規な超常磁性凝集体及び反応性安定剤物質はともに、活性物質である。

【特許請求の範囲】

1. (a) 磁界内で定められた行動をなす、粒径10ないし1000ナノメートルの範囲の安定で分解可能な凝集体を包含し、この凝集体が、
 - (b) 鉄酸化物、鉄酸化物混合物または鉄からなり、粒径が3ないし20ナノメートルの若干の小さな超常磁性単一ドメイン粒子の凝集体であり、かつ、
 - (c) さらなる結合部位を有することができる、ホスフェイト、ジホスフェイト、カルボキシレート、ポリホスフェイト、チオホスフェイト、ホスホネート、チオホスホネート、スルフェイト、スルホネート、メルカプト、シラントリオール、トリアルコキシシラン基含有ポリアルキレングリコール、カルボヒドレートまたはホスフェイト基含有ヌクレオチド、そのオリゴマーまたはそのポリマーを包含する群から選んだ化学的に結合された物質を表面に担持できることを特徴とする超常磁性粒子。
2. 請求の範囲1記載の超常磁性粒子において、前記超常磁性単一ドメイン粒子(b)の粒径が3ないし20nmの範囲であり、前記超常磁性凝集体(a)の粒径が10ないし1000nmの範囲であることを特徴とする超常磁性粒子。
3. 請求の範囲1または2記載の超常磁性粒子において、前記超常磁性単一ドメイン粒子(b)が、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 、 Fe_3O_4 及び一般式 $\text{MO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ に対応する鉄混合酸化物、ここでMは、2価の金属イオンFe、Mg、Be、Mn、Zn、Co、Ba、Sr、Cuまたはその混合物、または一般式 $m\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot n\text{Me}_2\text{O}_3$ に対応する混合酸化物、ここでMeは、3価の金属イオンAl、Cr、希土類金属またはその混合物、または鉄からなることを特徴とする超常磁性粒子。
4. 請求の範囲1ないし3のいずれかに記載の超常磁性粒子において、前記化学的に結合した物質(c)が、次に記載する物質から選んだことを特徴とする超常磁性粒子。

(i) 一般式 $\text{X}-\text{R}-\text{A}-\text{B}$ に対応する化合物

ここで、Xは、アルキル部分の炭素原子が1ないし4の範囲の数であるアルコキシ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアミノ及びアルキ

ルチオ基から選んだ官能基、またはヒドロキシ、アミン、アルデヒド、ジメチルアセタール、ジエチルアセタール、エポキシ、チオール、カルボキシ、4, 6-ジクロロトリアジン、ヒドロキサム酸、イソシアネート、アシルアジド、酸無水物、ジアソニウム塩、イミノカルボネート、及びトルエンスルホネート基から選んだ官能基、

Rは欠除か、または

Rは、ポリアルキレングリコール、水混和性ポリプロピレングリコール基または、

$(\text{PEG})_a - (\text{PEG})_b$ 、 $(\text{PEG})_a - (\text{PPG})_b - (\text{PEG})_a$ 、

$(\text{PPG})_b - (\text{PEG})_a - (\text{PPG})_b$ ブロック共重合体

(ここで、PEGはポリエチレングリコール、PPGはポリプロピレングリコール、aは1から100までの範囲の正の整数、bは

1から20までの範囲の正の整数とする、

nは、PEGについては4から300までの範囲から選んだ正の整数、PPGについては3から12までの範囲から選んだ正の整数、PEG-PPGブロック共重合体については3から140までの範囲から選んだ正の整数とする)

から選んだポリエチレングリコール(PEG)及びポリプロピレングリコール(PPG)の水混和性ブロック共重合体基か、または

Rは、モノサッカリドグルコース、フルクトース、リボース、デスオキシリボース、イノシトールから、またオリゴサッカリドサッカロース、ラフィノース、ゲンチアノース、マレシトース、スタキオース、バーバスコースから、ポリサッカリドスターチ、リケニン、グリゴーゲン、デキストリン、デキストラン、イヌリン、フルクトサン、ラバン、マンナン、ガラクトン、キシラン、アラバン、ベクチン、マクロポリサッカリド、グリコプロテインから、ポリウリデニル酸、ポリグルクロン酸、ポリガラクトン酸、ポリマンヌロン酸、及び/またはアルギン酸から選んだ炭水化物基であり、

Aは、欠除か、または

Aは、アルキル、アルコキシ、アシル、アシルアミン、アルキルアミン基(こ

ここでアルコキシ、アシル、アシルアミン、アルキル基の炭素原子数は1ないし4の範囲とする)であり、

Bは、モノホスフェイト、ジホスフェイト、ポリホスフェイト、ホスホネート、チオホスフェイト、チオホスホネートから選んだ

リン含有基、またはカルボキシレート、スルフェート、スルホネート、メルカプト、シラントリオールまたはトリアルコキシシラン含有基であり、

(ii) ホスフェイト基含有ヌクレオチド モノー、ジ、トリ リン酸エステル、またはアデノシン、グアノシン、キチジン、ウリジン、シミジン、デソキシアデノシン、デソキシグアノシン、デソキシシチジン、デソキシシミジン、イノシン、ピリミジン、シトシン、ウラシル、シミン、プリン、アデニン、グアニン、メチルキトシン、5-ヒドロキシメチルキトシン、2-メチルアデニン、1-メチルグアニン、チアミン、フラビン、リボフラビン及びピリドキサルホスフェイト、ピリドキサミンホスフェイト、リボ核酸、リボ核酸シーケンス、デソキシリボ核酸、デソキシリボ核酸シーケンスのモノ、ジ、トリリン酸エステルクロライド、

(iii) オルトケイ酸のケイ酸塩基含有化合物及びその縮合生成物、及び/または、

(iv) $X-R-A-B$ が、メルカプトプリン、メルカプトシトシン、メルカプトグアニン、メルカプトウラシル、メルカプトシミン、メルカプトヒポキサンシン、及びそのメルカプトヌクレオシド及びそのメルカプトデソキシヌクレオシドである。

(v) $X-R-A-B$ がポリアミノカルボヒドレートである。

5. 請求の範囲1ないし4のいずれかに記載の超常磁性粒子において、

(i) 抗原、抗体、リボ核酸、デソキシリボ核酸、リボ核酸

シーケンス、デソキシリボ核酸シーケンス、ハプテン、プロテインA、プロテインG、エンドトキシン結合プロテイン、レクチン、セレクチンを包含する群から選んだ組織特定結合物質、

(ii) 抗腫瘍プロテイン、酵素、抗腫瘍酵素、抗生物質、植物性アルカロイド、アルキル化剤、代謝阻害剤、ホルモン、ホルモンアンタゴニスト、インターロイキン、インターフェロン、成長因子、腫瘍ネクロシス因子、エンドトキシン、リンホトキシン、ウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ、プラスミノージェンーストレプトキナーゼーアクチベータ錯体、組織プラスミノージェンーアクチベータ、デスモーズスープラスミノージェンーアクチベータ、マクロファージーアクチベータ体、アンチセラ、プロテアーゼインヒビタ、及び／または放射性リン³²P含有安定剤物質、表面活性剤を包含する群から選んだ薬理活性物質、

(iii) 細胞器官、ウイルス、細菌、藻類、菌類、ことに赤血球、血小板、顆粒白血球、単核白血球、リンパ球、及び／またはランゲルハンス島を包含する群から選んだ薬理活性細胞、

(iv) ポリカルボキシル酸、アミノカルボキシル酸、ポルフィリン、カテクラミンを包含する群から選んだ薬理活性錯体、

(v) ホスフェイトまたホスホネート基含有薬、及び／または

(vi) 細胞融合促進物質、

が化学的に結合されていることを特徴とする超常磁性粒子。

6. 請求の範囲1記載の超常磁性粒子の製法において、超常磁性単一ドメイン粒子(b)が、鉄塩溶液をpHが8.0から10.0の範囲のアルカリ液またはアンモニア性液を加えて沈殿させ、

酸を加えてpH3ないし7に調整し、50ないし120℃の範囲の温度において凝集させ、公知の方法により精製し、前記有機物質(c)の20ないし50重量%と反応させ、公知の方法で精製し、場合によっては公知の方法で薬理的にまたは診断的に活性の物質と結合させることを特徴とする方法。

7. 薬理的に受け入れられるキャリアと、粒径10ないし1000nmの範囲の請求の範囲1記載の超常磁性粒子と、さらに場合によっては、組織特定結合物質と、薬理活性物質と、薬理活性細胞と、薬理活性錯体形成成分と、請求の範囲5記載の群から選んだ細胞融合促進物質とからなる薬理活性調剤。

8. 腫瘍の破壊、免疫の増強、場合によっては磁界の影響下においてのこれら

のこのための請求の範囲7記載の薬理活性調剤の使用。

【発明の詳細な説明】

超常磁性粒子、その製法及びその用途

本発明は、表面に化学的に結合した物質を有し、任意にはさらに、組織特定物質、診断または薬理学的に作用する物質を結合する、さらなる結合位置を所有する超常磁性粒子、及び新規な関連する化合物、及びこの超常磁性粒子及び化合物を腫瘍の破壊、免疫の増強及び病状の診断に用いる医薬への用途に関する。

磁性粒子については、多くの刊行物及び特許に、ことに磁気分離技術及びNMR診断におけるコントラスト剤として、記載されている。

1960年代には、強磁性粒子を、X線診断のコントラスト剤として、また磁氣的に制御された医薬の目標点投与剤として用いる試みがなされた。これらについては、例えば、Meyers, P. H. et al. J. Am. J. Roentgenol. Radium Ther. Nucl. Med., 90, 1068, 1963; Frei, F. H. et al. J. Appl. Phys., 39, 999, 1968; Nakamura et al. J. Appl. Phys., 42, 1320, 1971を参照されたい。磁界の影響下における磁性粒子の非可逆的凝集は、生体内投与において問題であることが分かっている。同じことが、DE-A-3590398, US-A-4, 675, 173, US-A-4, 615, 879, W084/02643, GB-A-8408127及びW084/04330にいえ。結合させようとする組織に対する結合親和性を物質に与え得るポリマー被覆を備えた数百から数千オングストローム単位程度のワイズドメインの強磁性粒子が、ここでは提案されている。

提案されている粒径の強磁性粒子は、これがポリマー被覆を備えている場合でも、粒子が固まりになって大きな凝集体を形成するような大きな磁気モーメントを有している。この強磁性粒子は、被覆工程中でさえ凝集体の形となっている。このような強磁性粒子は、非経口的投与においても体内に沈積され、毒性の副作用が著しい。

同様の欠点が、DE-A-3443251及びDE-A-3443252において用いられている強磁性粒子の分散液にもいえる。この場合、強磁性粒子間の磁気相互作用が、凝集、沈積を導くのである。磁性粒子の非可逆的沈積は、ことに磁界の影響の下では非常に急速に生じる。磁界が非等質性であると、磁性粒子は、きまって磁界強度の高い点に集中する。この欠点は、ことにNMR診断及び磁性薬剤目標投与において

生じ、粒子の非常に大きな非可逆的凝集体が形成されて、血管に塞栓が詰まる大きな危険性を生ずるのである。

さらに大きな強磁性粒子について、US-A-3, 933, 997, US-A-3, 652, 761, Nature 270, 259, 1977, J. Allergy Clin. Immunol. 61, 23, 1978, US-A-4, 177, 253, Clin. Chem., 26, 730, 1980, Clin. Chem., 26, 1281, 1980, US-A-3, 970, 518, US-A-4, 230, 685, US-A-4, 267, 234, US-A-4, 152, 210, US-A-4, 343, 901に記載されている。10ないし160ミクロンの粒径のこれらの磁性粒子は、弱い磁界によっても分離されるが、その沈積が非常に急速であるという欠点を有し、薬理学的に活性を有する物質の結合のための特定表面面積が小さく、磁界中で非可逆的に凝集し、血液塞栓の危険ゆえに目標投薬のためには余りにも大きい。

これらの超常磁性粒子の水性分散液内での沈積を妨げるために、吸着により粒子表面にそれ自体で付着する安定剤物質を添加する。このような粒子は、US-A-3, 215, 572, US-A-3, 531, 413, US-A-3, 917, 538, W085/02772, US-A-4, 101, 435及びUS-A-4, 452, 773, SE-A-8307060-7に記載されている。

吸着安定化磁性粒子は、生理学的な条件下では安定でない。これは、安定剤物質が釈放されるので容易に凝集するからである。特定の組織に対する結合親和性または薬理的な活性を有する物質が吸着安定化磁性粒子に結合されるならば、安定剤物質、従って結合親和性及び薬理活性を備えた物質は、磁性粒子から釈放され、この磁性粒子は結合部位に達しないか、或いは薬理活性物質が磁性目標投薬中に作用部位において濃厚化されないという危険がある。

EP-A-0284549においては、安定剤物質はリン酸塩（ホスフェイト）またはホスホン酸塩（ホスホネート）基を含有し、これらにより安定剤物質は、超常磁性粒子の表面に化学的に結合する。この安定剤物質がなお、化学的に反応性のある基を包含すると、薬理活性物質を結合することができる。これらの化学的に安定化した超常磁性粒子な水性分散液中で沈積せず、僅かに0.003ないし0.01 μm の粒径を有するのみである。非経口投薬中に安定剤物質を釈放することがない。すなわち、血液中での凝集や沈積がなく、従って生体内での分布が良好である。

これらの磁性粒子は磁性薬目標投与のためには余りにも小さく、身体の特定領域において磁性粒子を濃厚化するためには、非常に

大きな磁界勾配を用いなければならない。

小さな0.01 μm の超常磁性粒子を、多孔質ポリマー粒子(SE-A-7706431)、ポリグルタルアルデヒドポリマー(US-A-4,267,234)、シランポリマー(US-A-4,554,088)、アルブミン濃縮ポリマー(US-A-4,675,173)またはセルローズエステル(Ito, R. et al., Int. J. Pharm., 61, 109, 1990)内にカプセル化することにより、より大きな超常磁性粒子を作ることができる。この粒子の径は、0.05ないし100 μm の範囲である。アルブミン濃縮ポリマー及びセルローズエステル以外の使用されるすべての重合薬品は、生理的に有害であり、体の中での磁性粒子の溶解率は非常にゆっくりである。上述のすべての大きな超常磁性粒子は、地球の重力場において沈積し、従って使用に先立って再分散させなければならない。

ポリマー粒子の酸化鉄成分は、重量比にして10ないし最高50パーセント、容量比にして最高10パーセントの範囲である。磁性粒子が少ないほど、体の特定の領域においてこの磁性粒子を集中させるためには磁気目標投薬時に必要とされる磁界勾配は高くなる。磁性粒子の粒径が大きいほど、これらの磁性粒子は網内皮系によって結合される。すなわち生体適合性(バイオコンパティビリティ)が減少し、結合された薬理的活性物質の量が減少する。それ故、磁気目標投薬のための最適磁性粒子をできるだけ少なくし、薬理的活性物質の量を可能な限り多くし、磁性材料の量を可能な限り最大限とし、この磁性材料の透磁率を可能な限り最大限とし、体内における溶解率を可能な限り最大限として、適度の生

体適合性を有するようにしなければならない。

請求の範囲1に特定された本発明の目的は、冒頭に述べた欠点を回避し、さらに新たな適用領域、ことに腫瘍の破壊及び免疫の増強という適用領域を開くために、新規な化合物及び超常磁性粒子を作り出すことにある。

本発明によれば、非常に小さな超常磁性の単一ドメイン粒子は凝集されるが、この超常磁性粒子の表面上の反応性安定剤物質の化学的結合により、さらなる凝

集からは保護されることで、上述の目的が達成される。この新規の超常磁性凝集体は、その反応性安定剤物質とともに、本発明における活性物質となる。

生物分解性を高く、毒性を可能な限り低く保つために超常磁性単一ドメイン粒子を可能な限り小さく作ることが有利である。この超常磁性単一ドメイン粒子は粒径が0.001ないし0.02ミクロンの範囲、好適には0.003ないし0.01ミクロンの範囲である。

$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 、 Fe_3O_4 及びFeが、生体内投与用の生理的適合性のある物質として使用される。さらに毒性のある磁性材料も生体外の適用として使用できる。例えば、一般式 $\text{MO-Fe}_2\text{O}_3$ に対応する鉄混合酸化物、ここでMは、Fe、Mg、Be、Mn、Zn、Co、Ba、Sr、Cuまたはその混合物のような2価のイオン、または一般式 $m\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot n\text{Me}_2\text{O}_3$ 、ここでMeはAl、Cr、希土類金属またはその混合物のような鉄混合酸化物があげられる。

本発明によれば、超常磁性単一ドメイン粒子は、pH、温度及び

場合によっては圧力を変えることによる水性分散液中での熱処理により凝集される。驚くべきことに、この超常磁性単一ドメイン粒子は、沈殿分散液のpHが8.0から10.0までの範囲から3.0から7.0の範囲に変化し、50℃から120℃までの範囲の温度に加熱した時に、より大きな超常磁性粒子の集塊になるという事実が見い出されたのである。驚くべきことには、この際、強磁性粒子に導かれるような結晶成長が生じることがなく、かえって単一ドメイン粒子の単なる凝集が粒子のより大きな結集を生じ、これによって集塊の超常磁性特性が維持されるのである。この集塊の安定性は、安定化超常磁性単一ドメイン粒子の極く僅かな部分が、後の安定剤物質の添加によって形成されるに十分な程度に大きい。近接した粒径範囲内の異なった粒径が、pH温度、温度勾配、凝集時間、電解質の型式、及び水性分散液の電解質濃度に従って生成される。分散液のpHが低いほど、凝集が大きくなる。温度の上昇及び凝集時間の延長は、同じ方向に作用する。凝集時間が余りにも長いと、本発明の用途に適さない強磁性粒子が多くなる。電解質の型式及び電解質の濃度もまた、超常磁性単一ドメイン粒子の電気化学的複層の厚さを介して粒子の凝集に作用する。

作り出すことができる粒径は、0.01ミクロンないし10ミクロンの範囲であるが、好適には0.02ミクロンないし1ミクロン、ことに0.02ミクロンないし0.5ミクロンの範囲である。小径の粒子が、その表面面積の大きさ及びこれに関して活性成分の結合が多いことを考えると、好適である。

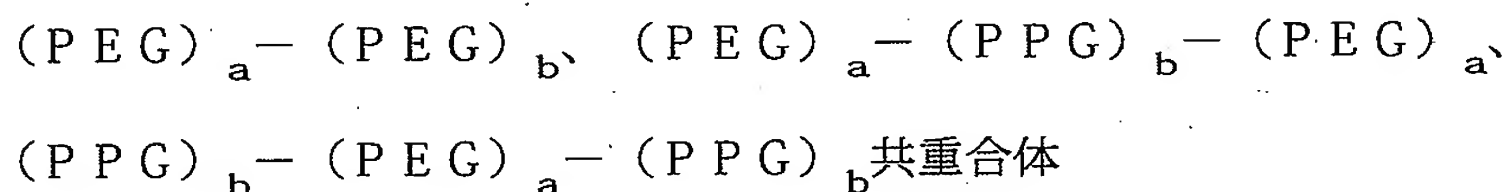
本発明によると、磁性粒子は、超常磁性粒子の表面の安定剤物質としての、モノホスフェイト、ジホスフェイト、ポリホスフェイト、ホスホネート、チオホスホネートから選んだホスホン酸含有基、またはカルボキシレート、スルフェイト、スルホネート、メルカプト、シラントリオール、またはトリアルコキシシラン含有基の化学的結合により安定化される。この安定剤物質は、それが水と混和でき、磁性粒子の間隔を、この磁性粒子の動力学的エネルギーが相互作用の磁気エネルギーよりも大きくなるのに十分な程度に大きく維持する。安定剤物質は、以下の物質から選ぶことができる。

(1) 一般式 $X-R-A-B$ に対応する化合物

ここで、Xは、アルキル部分の炭素原子が1ないし4の数であるアルコキシ、アルキルアミノ及びアルキルチオ基から選んだ官能基か、またはヒドロキシ、アミン、アルデヒド、ジメチルアセタール、ジエチルアセタール、エポキシ、チオール、カルボキシ、4,6-シクロロトリアジン、ヒドロキサム酸、イソシアネート、アシルアジド、酸無水物、ジアソニウム塩、イミノカルボネート、トルエンスルホネート基から選んだ官能基、

Rは欠除か、または

Rは、ポリアルキレングリコール、水混和性ポリプロピレングリコール基または、



(ここで、PEGはポリエチレングリコール、PPGはポリプロピレングリコール、aは1から100までの範囲の正の整数、bは1から20までの範囲の正の整数とする、

nは、PEGについては4から300までの範囲から選んだ正の整数、PPGについては3から12までの範囲から選んだ正の整数、PEG-PPGブロック共重合体については3から140までの範囲から選んだ正の整数とする)

から選んだポリエチレングリコール(PEG)及びポリピロピレングリコール(PPG)の水混和性ブロック共重合体基か、または

Rは、モノサッカリドグルコース、フルクトース、リボース、デスオキシリボース、イノシトールから、またオリゴサッカリドサッカロース、ラフィノース、ゲンチアノース、マレシトース、スタキオース、パーパスコースから、ポリサッカリドスターチ、リケニン、グリゴーケン、デキストリン、デキストラン、イヌリン、フルクトサン、ラバン、マナン、ガラクタン、キシラン、アラバン、ペクチン、マクロポリサッカリド、グリコプロテインから、ポリウリデニル酸、ポリグルクロン酸、ポリガラクツロン酸、ポリマンヌロン酸、及び/またはアルギン酸から選んだ炭水化物基であり、

Aは、欠除か、または

Aは、アルキル、アルコキシ、アシル、アシルアミン、アルキルアミン基(ここでアルコキシ、アシル、アシルアミン、アルキル基の炭素原子数は1ないし4の範囲とする)であり、

Bは、モノホスフェイト、ジホスフェイト、ポリホスフェイト、ホスホネート、チオホスフェイト、チオホスホネート、から選んだリン含有基、またはカルボキシレート、スルフェート、スルホネート、メルカプト、シラントリオールまたはトリアルコキシシラン含有基である。

(ii) ホスフェイト基含有ヌクレオチド モノ、ジ、トリ リン酸エステル、またはアデノシン、グアノシン、キチジン、ウリデン、シミデン、デソキシアデノシン、デソキシグアノシン、デソキシシチデン、デソキシシミデン、イノシン、ピリミデン、シトシン、ウラシル、シミン、プリン、アデニン、グアニン、メチルキトシン、5-ヒドロキシメチルキトシン、2-メチルアデニン、1-メチルグアニン、チアミン、フラビン、リボフラビン及びピリドキサールホスフェイト、ピリドキサミンホスフェイト、リボ核酸、リボ核酸シーケンス、デソ

キシリボ核酸、デソキシ核酸、デソキシ核酸シーケンスのモノ、ジ、トリリン酸エステルクロライド。

(iii) オルトケイ酸のケイ酸塩基含有化合物及びその縮合生成物、及び／または、

(iv) $X-R-A-B$ が、メルカプトプリン、メルカプトシトシン、メルカプトグアニン、メルカプトウラシル、メルカプトシミン、メルカプトヒポキサンシン、及びそのメルカプトヌクレオシド及びそのメルカプトデソキシヌクレオシドである。

(v) $X-R-A-B$ がポリアミノカルボヒドレートである。

安定剤物質の例をあげると次の通りである。

(vi) モノ及びジ [ω -エチルアミノポリエチレングリコール] -シホスフェイト [PEGの分子量(分子量)約1500]、ポリグリコールM41/40 (ドイツヘキスト社の商品名) から生成したモノ及びジ [ω -エトキシポリエチレングリコール] -チオホスフェイト (PEGの分子量約1000)、またはモノ及びジ [ω -メトキシポリエチレングリコール-ポリプロピレングリコール] -ホスフェイト

モノ及びジ [ω -ヒドロキシポリエチレングリコール] -ホスフェイト (PEGの分子量約1500)、及びモノ及びジ [ω -オキソエソキシポリエチレングリコール] -ホスフェイトまたはそのアセタール (PEGの分子量約2000)、モノ及びジ [ω -オキソエチルアミノポリエチレングリコール] -ホスフェイトまたはそのアセタール (PEGの分子量約750)、モノ及びジ [ω -アミノアルコキシポリエチレングリコール] -チオホスフェイト (PEGの分子量約1000)、シンパーロニックF68 (英国ICI社の商品名) から生成したモノ及びジ [ω -ヒドロキシポリエチレングリコールポリプロピレングリコール] -ホスフェイト、モノ及びジ [ω -メトキシポリエチレングリコール] -ジホスフェイト (PEGの分子量約1000)、モノ [ω -オキソエトキシポリエチレングリコール] -ジホスフェイトのジメチルアセタール (PEGの分子量約2000)、モノ [ω -エトキシポリエチレングリコール] -ポリホスフェイト (P E

Gの分子量約2000)、ポリグリコールM-41/40(ドイツヘキスト社の商品名)から生成したモノ[ω -メトキシ

ポリエチレングリコールポリプロピレングリコール]-ジホスフェイト。

これらの反応性ポリアルキレングリコール含有安定剤物質はまた、ヒドロキシル、カルボニルまたはアミノ基とともに用い、他の反応性官能基、例えばチオール、エポキシ、カルボキシ、4, 4, 6-ジクロロトリアゾンヒドロキサム酸、イソシアネート、アシラジド、アンヒドリド、ジアソニウム塩、イミノカルボネート、トルエンスルホネート基、を導入して、組織特定及び薬理活性物質のための他の結合部位を形成させる。

(ii) ホスフェイト基含有ヌクレオチドの、アデノシン、グアノシン、シチジン、ウリジン、シミシン、デソキシアデノシン、デソキシグアノシン、デソキシシチジン、デソキシシミジン、イノシン、ピリミシン、シトシン、ウラシル、シミン、プリン、アデニン、グアニン、メチルシトシン、5-ヒドロキシメチルシトシン、2-メチルアデニン、1-メチルグアニン、シアミン、フラビン、リボフラビン、さらにはピリドキサルホスフェイト、ピリドキサミンホスフェイト、リボ核酸、リボ核酸シーケンス、デソキシリボ核酸、デソキシリボ核酸イーケンスのモノ、ジ、トリリン酸エステルまたはモノ、ジ、トリリン酸エステルクロライド。

(iii) ホスフェイト、ジホスフェイト、ポリホスフェイト及びチオホスフェイト、カルボキシレート、スルフェイト、スルホネート、メルカプト、シラントリオールまたはトリアルコキシシラン基含有カルボキシヒドレート。カルボキシヒドレート基は、モノサッカリドグルコース、オリゴサッカリドサッカロースのフルク

トース、リボース、デソキシリボース、イノシトール、ポリサッカリドスターチのラフィノース、ゲンチアノース、マレシトース、スタキオース、ベルバスコース、ポリウリジニル酸、ポリグルクロン酸、ポリガラクトロン酸、ポリマンウロン酸及び/またはアルギン酸のリケニン、グリコーゲン、デキストリン、デキス

トラン、イヌリン、フルクトーサン、ラハン、マンナン、ガラクトン、キシラン、アラバン、ペクチン、マクロポリサッカリド、グリコプロテイン。さらには、これらの基のいくつか。

本発明によれば、組織特定結合物質または薬理的に活性の物質は、安定剤物質が少なくともふたつの化学的に反応性のある官能基、すなわち、超常磁性粒子に対する化学的結合のためのホスフェイト、ジホスフェイト、ポリホスフェイト、チオホスフェイト、ホスホネート、チオホスホネート、カルボキシレート、スルフェイト、スルホネート、メルカプト、シラントリオールまたはトリアルコキシシラン基、及び残りの官能基、すなわち、例えば組織特定結合物質及び薬理活性物質の結合に没立つヒドロキシル、アミン、アルデヒド、エポキシ、チオール、カルボキシ、4, 6-ジクロロトリアジン、ヒドロキサミン酸、イソシアネート、アシルアジド、アンヒドリド、ジアソミウム塩、イミノカルボネート、トルエンスルホネート基を有するならば、超常磁性粒子に結合したこの安定剤物質に結合されるのである。

このような安定剤物質は、例えばモノ、オリゴまたはポリサッカリドホスフェイト、カルボキシレート、スルフェイト、スルホネート、チオール、シラントリオール、またはトリアルコキシシ

ランを包含する。これらは、超常磁性粒子の表面に化学的に結合する前または後に対応する官能基を備えている。上述の安定剤物質はまた、対応するポリ酸を包含している。官能基を安定剤分子に導入することは、当業界において公知である。

カルボキシヒドレートを基礎とするこれらの反応性安定剤物質に加えて、反応性ホスフェイト基含有バイオ分子を使用することが可能である。例えば、ピリミドキサルホスフェイト、ピリミドキサミンホスフェイト、またはコ-カルボキシラーゼ；例えばメルカプトプリン、-シトシン、-グアニン、-ウラシル、-シミン、-ヒポキサンシン、さらにこのメルカプトヌクレオシド及びそのメルカプトデソキシヌクレオシドのようなメルカプト基含有物質；例えば ω -エチルアミノ-ポリエチレングリコール-トリメトキシシラン（PEGの分子量は約100

0)、 ω -メトキシポリエチレングリコールトリメトキシシラン (PEGの分子量は約750) またはポリエチレングリコールM41/40 (ヘキスト社) から得た ω -メトキシポリエチレングリコール-ポリプロピレングリコール-チオエチルトリエトキシシラン、 ω -ヒドロキシポリエチレングリコール-シラントリオール、3-クロロプロピルトリメトキシシラン、2-メルカプトプロピルトリエトキシシラン、3-アミノプロピルトリメトキシシラン、3-(2-アミノエチルアミノ)プロピルトリメトキシシラン、ビニルトリエトキシシラン、ビニルトリ(メトキシエトキシ)シラン、メタクリルオキシプロピルトリメトキシシラン、またはポリ-トリアルコキシシリルースターチ、ポリ-トリ

アルコキシシリル-デキストラン、ポリ-トリアルコキシシリル-デキストリン；例えばデキストランスルフェイト、デキストリンスルフェイト、イヌリンスルフェイトのようなスルフェイト基含有物質；例えばポリカルボキシデキストラン、ポリカルボキシデキストリン、ポリカルボキシアミロペクチンのようなカルボキシレート基含有物質；ポリアミノデキストランのようなポリアミノ基含有物質；オルトケイ酸及びその縮合生成物のシリケート基含有化合物、超常磁性粒子の安定化にここで使用される濃縮可能なヒドロキソアルミネートを伴うアルカリシリケートのナトリウムシリケートまたはカリウムシリケート溶液またはアルカリ溶液；さらにそのポリ化合物である。

本発明によれば、例えば抗原、抗体、ハプテン、プロテインA、プロテインG、エンドトキシン結合プロテイン、レクチン、セレクチンのような組織特定結合物質が安定剤分子に結合できる。この安定剤分子は、そのモノホスフェイト、ジホスフェイト、ポリホスフェイト、ホスホネート、チオホスフェイト、チオホスホネート、カルボキシレート、スルフェイト、スルホネート、メルカプト、シラントリオール、またはトリアルコキシシラン基をもって超常磁性粒子表面に化学的に結合され得る。

例えば抗腫瘍プロテイン、酵素、抗腫瘍酵素、抗生物質、植物性アルカロイド、アルキル化剤、代謝阻害剤、ホルモン、ホルモンアンタゴニスト、インターロ

イキン、インターフェロン、成長因子、腫瘍ネクロシス因子、エンドトキシン、リンホトキシン、ウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ、プラスミノーゲンーストレ

プトキナーゼーアクチベーター錯体、組織プラスミノーゲンーアクチベータ、デスモーズスープラスミノーゲンーアクチベータ、マクロファージーアクチベータ体、アンチセラ、プロテアーゼインヒビター、放射性リン³²P含有安定剤物質、表面活性剤または例えば細胞器官、ウイルス、細菌、藻類、菌類、ことに赤血球、血小板、顆粒白血球、単核白血球、リンパ球、ランケルハンス島、またはポリカルボキシル酸、アミノカルボキシル酸、ポルフィリン、カテクラミンを包含する群から選んだ薬理活性細胞、または細胞融合促進物質のような薬理活性物質が、各別にまたは互いに反応性安定剤物質に結合させることができる。細胞融合促進物質としては、ポリエチレングリコール、例えば超常磁性粒子の安定剤物質内の高濃度の状態にある時でも約25重量パーセントの濃度のポリエチレングリコールが細胞融合をもたらす。この細胞融合は、ポリエチレングリコール含有超常磁性粒子が腫瘍中に濃縮されていると、腫瘍組織にさらに損害を与えることができる。

本発明によれば、ホスフェイトまたはホスホネート基含有薬はまた、例えば安定剤物質に加えて、エストラムスチン、ジェチルスチルベンストロールージホスフェイトを、超常磁性粒子の表面に化学的に結合することができる。

これら薬理活性物質の毒性は、磁性粒子がその組織特定相互作用により対応する結合部位において好適に集中されるため、または磁気薬目標投与によって活性部位に運ばれて集中されるため、比較的に高くすることができる。この薬理活性物質の投与量は、この物質他が活性部位に集中されるので少量に止めることができる、

体の他の部位では僅かな影響しか与えない。

薬理活性物質の超常磁性粒子への結合は、治療の過程が各磁気スピン診断によって観察でき、緩和時間の減少を介して更なる利益が得られる。

超常磁性粒子は、超常磁性単一ドメインの計画的な凝集によって生成される。超常磁性単一ドメイン粒子は、水中で攪拌されオートクレーブ中で 100°C 以上の温度、 50°C から 120°C までの温度に加熱してpH 3ないし7において集合させる。冷却後、粒子は、濾液の電気導通性が、 $10\mu\text{S}/\text{cm}$ 以下となるまで洗浄する。このようにして得た超常磁性粒子は、直ちに急速沈殿物を形成し、これは、激しく攪拌しても、また超音波処理をしても、安定した分散液とはなり得ない。超常磁性粒子の表面上に、ホスフェイト、ジホスフェイト、ポリホスフェイト、チオホスフェイト、ホスホネート、カルボキシレート、スルフェイト、スルホネート、チオール、シラントリオール、またはトリアルコキシシラン基含有物質を化学的に結合するに際しては、急速拡散を許容する。若干の安定剤物質では、ガラス棒によりわずかに攪拌する。

適用分野によっては、磁性分散液を透析して安定剤物質の過量分を取り除くことができる。透析は、組織特定結合物質及び薬理活性物質の結合に使用されるべき化学的に反応性の超常磁性粒子について必要である。

安定化超常磁性粒子分散液は、まだ凝集していないかまたは僅かに凝集している超常磁性単一ドメイン粒子を包含する。これらの単一ドメイン粒子は、安定な磁性液を形成し、この液は、適宜の

強さ及び非均一性の磁界中での沈殿により容易に、大きな超常磁性粒子から分離することができる。

磁気分離の簡単なやり方は、磁性分散液を入れたビーカを、磁束密度 0.1mT の永久磁石上に置き、約30分の沈殿時間の後、上澄みの磁性液をこぼす。超常磁性粒子はビーカ内に留まり、瞬時に分散液中に再分散するか、粒径に応じてビーカ中に沈積物として残る。超常磁性粒子は、約 500nm の粒径までのものが、同時にまたは僅かな攪拌に伴って再分布される。約 500nm より大きい粒径の超常磁性粒子は、激しく攪拌することにより、または超音波処理により容易に分散させることができる。

本発明による超常磁性粒子の沈積安定性は、同じような磁性特性を有する既知の磁性粒子の沈積安定性よりも目立って高い。これは、おそらく超常磁性粒子を

囲む水の分子が強い構造をなし、これによりストークの分子直径が増すことによると考えられる。

安定剤物質の分量が少ないので、超常磁性粒子の磁気特性は、これまで知られている磁性粒子の磁気特性よりも強力である。超常磁性単一ドメイン粒子の量は、従来知られている磁性粒子中における量よりも著しく高いので、非均質磁界中での超常磁性粒子の分離率も高い。粒径約100nmマグネタイト成分95%の超常磁性粒子の10重量%水性分散液において、磁束密度0.1mTの永久磁石上での磁性粒子の分離時間は1分である。

本発明による超常磁性粒子は、90ないし98重量%の鉄酸化物成分を有する。このことは、鉄酸化物の含有量50%までの従来の磁性粒子に比べて、磁気特性において可成りの改善があること

を意味する。従って、この新規の超常磁性粒子は、同じ磁気相互作用をなす既知の磁気粒子に比べてかなり小さくすることができる。特定表面積が増大し、より多くの薬理活性物質または組織特定結合物質をこの表面に結合させることができる。粒子寸法が減少するので、生物適合性が改善され、体内での分解率が増す。磁気目標投薬中、磁性粒子の自由有効時間すなわち粒子が網内系によって結合されるまでの時間もまた、粒径が減少するにつれて増大する。

体内における超常磁性粒子の生体適合性はわずか数分のこと、すなわち網内系が超常磁性粒子を非常に急速に結合する。マクロファージ及び好中球顆粒球は、これらが超常磁性粒子に付着すると磁化特性を帯びることとなる。この付着は、マクロファージや好中球顆粒球のレセプタに結合された超常磁性粒子の安定剤物質次第である。このような結合が生ずると、磁化されたマクロファージや好中球顆粒球は磁界によって動かされる。マクロファージや好中球顆粒球は、高内皮ベノールの内皮バリアに浸透し、組織内に入る。磁化されたマクロファージや好中球顆粒球をもってすれば、このプロセスは、磁界の効果により助けられる。本発明による超常磁性粒子を腫瘍に磁気目標投与すると、磁化されたマクロファージや好中球顆粒球の腫瘍内への加速濃縮が生じて、腫瘍組織の免疫学的破壊が開始される。

接触材料の間の透磁率の差及び作用する磁界の自乗に比例する機械的な力が、超常磁性粒子と反磁性細胞との位相境界に発生する。

本発明による粒子は超常磁性粒子量が非常に多く、安定剤物質は

数ナノメートルの単分子層であるのみであるので、細胞の破壊につながる力は反磁性細胞との位相境界において生ずるのである。この力は、腫瘍の破壊、例えば腫瘍内への超常磁性粒子の集中の過程において腫瘍の破壊を生じさせる。この磁気機械的効果はまた、超常磁性粒子の安定剤物質と腫瘍組織との相互作用時に、腫瘍組織の用面分子を超常磁性粒子に結合させ、この超常磁性粒子によって引き出されるようにする。これらの超常磁性粒子が、マクロファージ及び好中球顆粒球によって捕食されると、腫瘍の表面分子は、たとえこれらが免疫系によって抗原として認識されなくても、抗原として認識される。腫瘍の表面分子への多少なりとも強い免疫反応が生じ、従って腫瘍の破壊が生ずるのである。

磁気機械的な効果による免疫系の刺激はまた、反応性超常磁性粒子にウイルス、バクテリア、菌類を生体外で混合することにより達成することができる。このようにすることにより、例えばモノー[ω -オキソエトキシ-ポリエチレン-グリコール]-ホスフェイトを有する安定化された超常磁性粒子が、ウイルスまたはバクテリアの表面蛋白質のアミノ基に等価の化学的結合を果たすこととなる。ウイルス、バクテリア、または菌類の表面の表面分子は、強い均質の磁界の作用により、または既知の細胞消化法により超常磁性粒子で形成される。これらの超常磁性蛋白質フラグメントは、体の中に注入された時網内皮系によって吸収され、この蛋白質フラグメントは抗原として認識され、体は対応する免疫反応をもって反応する。中でも、適当な抗体を形成させるのである。それ故、体内の免疫反応はまた、体によって抗原そのものとして認

識されなかった蛋白質によって刺激され得る。このことは、今まで好適な化学療法がなかった、または今まで使用された医薬に対する抵抗性が生じている、腫瘍細胞、ウイルス、バクテリア、イーストまたは菌類に対する体の免疫防御の形成に特に重要である。

生体内投与によって免疫の刺激及び生物学的活性細胞の破壊に通ずることのできる免疫刺激超常磁性分子錯体は、例えば腫瘍細胞、ウイルス、バクテリア、イースト菌類の表面分子への反応性超常磁性粒子の結合により、及び強い非均質磁界を使ってまたは公知の細胞消化法によってこれらの表面分子を分離することにより得ることができる。

ポリアルキレングリコールを基礎とするジホスフェイトまたはポリホスフェイト含有安定剤物質は新規な化合物であり、これは腫瘍破壊効果を有する。

マウスの腫瘍が、この安定剤物質の生体内投与により破壊された。この腫瘍破壊効果は、これら安定剤物質を超常磁性粒子に結合することにより増強され得る。これは、腫瘍内の安定剤物質の集中が磁気目標投薬によって増大されるからである。磁気目標投薬による腫瘍破壊効果の増強に加えて、初めの目に見える腫瘍破壊に至る作用時間の可成りの減縮も観察される。

安定剤物質は従来技術によって容易に生成させることができる。

ポリエチレングリコールは、例えば2-メトキシエタノール、アミノアセタールデヒドridgeジメチルアセタール、2-メトキシエチルアミン、2-アミノエタノールにエチレンオキシドのよう

な反応性有機出発化合物のオキシレーションにより生成される。これについては、Houben-Weyl, volume XIV/2, page 425 et seq (1963) を参照されたい。

ポリエチレングリコールへのホスフェイト、ジホスフェイト、ポリホスフェイトまたはチオホスフェイト基の導入は、室温または高めた温度での各種リン酸化試薬により容易に行うことができる。これについては、Houben-Weyl, volume X11/2, page 131 et seq (1964), volume E2, X11/2, pages 300 et seq (1982) を参照されたい。

ホスホネート基含有カルボヒドレート及びホスフェイト基含有ポリサッカリドカルボキシル酸は、同様なやり方で生成される (US-A-2970141参照)。

ジメチルアセタールに対応するアルコールは、エトキシ化中及びホスフェイトまたはホスホネート基の導入中オキソ基を保護するために、 ω -オキソアルコキシ-ポリエチレングリコール ホスフェイトの生成の出発材料として好適に使用

される。アセタールは、酸を加えた酸性加水分解またはイオン交換器による深い開裂により自由化され得る。Houben-Weyl, volume VI/3, pages 203-293 (1964) 参照。

ホスホネイト基含有ポリエチレングリコールは、多くの方法により生成することができる。G. M. Kosolapoff, L. Maier, Organic Phosphorous Compounds Wiley Inters., New York, 1972-1976, volume 7, pages 1-486 (1976), Houben-Weyl, volume XI/1, pages 338-619 (1963), Houben-Weyl, volume E2, pages 300-486 (1982) 及びことにDE-A3407565, DE-A-2424453及びDE-A-3203309参照。

シリケート基含有有機物質は、一般式



に対応するリチウム有機化合物またはナトリウム有機化合物と、テトラアルコキシシランまたはトリアルコキシクロロシランとの反応によって生成される (Houben-Weyl, volume XIII/5, pages 180 et seq (1980) 参照)。

シリケート基含有有機化合物を生成するさらに簡単な方法は、 $X-R-$ (パートルエンスルホネート) と、例えば2-メルカプトプロピルトリエトキシシラン、3-アミノプロピルトリエトキシシランとをアルカリ性媒体中で反応させることである (K. Nilsson, K. Mosbach; Eur. J. Biochem. 112, 397-409, 1980 参照)。

メルカプト基含有有機物質は、例えば $X-R-$ ハロゲン化合物をチオ尿素と反応させ、次いでアルカリ加水分解し、対応するメルカプト化合物とすることにより生成される (Houben-Weyl, volume IX, pages 3 et seq (1955), volume E2, XI E, pages 32 et seq (1985) 参照)。

ポリカルボキシル酸基含有カルボヒドレートは、カルボヒドレートの酸化、例えばマンガン酸カリ、イオン (II) 塩/水素 過酸化物、過ヨウ素酸による酸化により生成される (A. H. Haines, Editor, Methods for the Oxidation of Organic Compounds, Academic Press, London, 1988 参照)。

シリケート基含有無機凝集生成物は、単にナトリウムシリケート溶液を、例えばナトリウムアルミネートに混合するだけで生成される。

ポリスルフェート基含有カルボハイドレートは、例えばカルボハ

イドレートのクロロスルホン化により生成される。

本発明による超常磁性粒子の主用途は、磁気目標投薬の分野である。磁性材料の含有量が非常に多い（90ないし98重量%）ので、小さな磁性粒子でも電磁場または永久磁石の磁場により、体の特定の領域に非常に良好にかつ非常に急速に集中させることができる。薬理活性物質が超常磁性粒子と結合している時、その濃度は作用部位において劇的に増大する。この事実は、癌の治療において特に重要である。何故ならば、腫瘍の化学療法に用いられる物質は全器官に非常に際だった副作用を与えるが、作用場所に集中していれば、体の残りの部分は細胞分裂抑制剤によって著しく影響されない。

超常磁性粒子は、ウイルス、細胞及びその表面分子と結合している時、体の免疫活性化に使用することができる。この時、磁界の効果は免疫活性化を助ける。

反応性超常磁性粒子はまた、対応する診断物質がこの粒子の表面に化学的に結合しているならば、生体外診断に使うことができる。磁界との際だった磁気相互作用のため、非常に小さな超常磁性粒子でも、診断反応の後再び反応混合物から容易に分離することができる。

超常磁性粒子はまた、核スピン診断のためのコントラスト剤として用いることができる。

磁気目標投薬中、使用される超常磁性粒子の濃度は、粒径、安定剤物質の塑性、作用部位における磁界強さ及び注射部位と作用部位との間の距離に依存する。

裸のマウスの腫瘍の壊死を果たさせ

るためには、血液量の約0.01ないし0.2容量%の注射液量が必要で、磁気飽和誘導は約5 mTである。

MRIのためのコントラスト剤としての適用にあたっての超常磁性粒子の量は、磁気飽和誘導が約5 mTである時、血液容量の約0.001容量%である。

本発明による超常磁性粒子の製造を、以下に例を示して述べる。

例 1

塩化鉄(III) (270 g) 及び塩化鉄(II) (119 g) を、蒸留水1リットルに溶解する。この溶液のpHは、攪拌しながらアンモニア性液を添加することにより9.6に調整される。沈降をさせた後、塩酸により分散液をpH6.0に調整し、この分散液を100℃に加熱する。冷却後、濾液の電気導通性が $10\ \mu\text{S}/\text{cm}$ 以下になるまで、沈殿物を蒸留水で洗浄する。このようにして形成された超常磁性粒子は Fe_3O_4 からなる。これは安定化され得る。

例 2

塩化鉄(III) (270 g) と硫酸鉄(II) (153 g) とを蒸留水1リットルに溶解する。攪拌しながらアンモニア性液を添加して、この溶液のpHを9.0に調整する。沈降させた後、分散液を、攪拌しながら塩酸を加えることにより、pH5.0に調整する。これを30%水素過酸化物溶液(22 ml)と反応させ、30分間80℃に加熱する。分散液を冷却後、沈殿物を、濾液の電気導通性が $10\ \mu\text{S}/\text{cm}$ 以下になるまで洗浄する。このようにして形成された超常磁性粒子は、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ からなり、安定

化され得る。

例 3

塩化鉄(III) (270 g) 及び塩化亜鉛(82 g) を、蒸留水1リットルに溶解する。攪拌しながら苛性カリを加えて、pH8.5に調整する。沈降させた後、分散液に塩酸を加えながら攪拌してpH4に調整し、オートクレーブ中において110℃に加熱する。この分散液を冷却後、濾液の電気導通性が $10\ \mu\text{S}/\text{cm}$ 以下になるまで沈殿物を水洗する。形成された亜鉄酸亜鉛は安定化され得る。

この超常磁性粒子は、室温において水性または低沸点極性溶媒含有安定剤溶液をこの磁性粒子に混合することにより安定化される。安定剤溶液は、所望の特性に依存して、純粋な安定剤物質または安定剤物質混合物とすることができる。分散及び安定化を促進するために、分散液を攪拌するか、超音波処理することができる。低沸点有機溶媒を用いるならば、安定化の後、真空蒸発または透析によりこれを除去することができる。

この超常磁性粒子の安定化については、例をあげて後述する。

例 4

例1により得たマグネタイト沈殿物のすべてを、蒸留水500ml中モノ[ω -メトキシポリエチレングリコール]-ホスフェイト（分子量約1000）50gの溶液内に導入し、5分間攪拌する。形成された分散液は、磁束密度0.1Tの永久磁石上で30分間沈降させる。表面に浮かんだ材料を磁性流体から吸引する。磁界上の沈積物に超常磁性粒子が含まれる。この超常磁性粒子は、

蒸留水で洗浄し磁界内に沈積をなす工程を数回繰り返すことにより純化され、粒径の分布も揃う。この超常磁性粒子は、平均粒径120nmである。この超常磁性粒子は、腫瘍における磁気集中に非常に好適である。これは、磁気機械的免疫刺激またはこれに加えて高体温、すなわち電磁線照射及び腫瘍加熱により、腫瘍を破壊することができる。超常磁性粒子はまた、MRI用の経口または静脈注射のコントラスト剤として用いることができる。

例 5

例3で得た亜鉄酸亜鉛沈殿物のすべてを、蒸留水500ml中にジー[ω -メトキシポリエチレングリコール]-ホスフェイト（分子量約1500）50gの溶液中に導入し、100Wの出力の超音波により5分間分散させる。この結果得られる超常磁性粒子は、粒径310nmである。分散液は蒸留水に対して透析し、0.45 μ mのフィルタにより濾過する。この結果得られた製品は、MRI用の経口コントラスト剤として用いることができる。

例 6

例2で得た γ -Fe₂O₃粒子のすべてを、蒸留水500ml中モノ[ω -オキソエトキシポリエチレングリコール]-ホスフェイト（分子量約1800）20g及びジー[ω -メトキシポリエチレングリコール]-ホスフェイト（分子量約1000）15gの溶液中に導入し、超音波分散器（出力100W）により5分間分散させる。得られた分散液を50kDフィルタを通して蒸留水に対して透析し、過量分の安定剤物質を取り除く。凝集していないか、または弱く凝集しているのみの安定した磁性流体を形

成する超常磁性単一ドメイン粒子が、例4に記載したような磁気沈積によって分離される。この超常磁性粒子は、平均粒径180nmである。

例6に従って作った超常磁性粒子は、アルデヒド基の反応性が適用される多くの結合反応に用いることができる。例えば、ストレプトキナーゼまたはプラスミノーゲンストレプトキナーゼアクチベータ錯体のようなアミノ基含有薬理活性物質の結合に用いられる。

例 7

磁気飽和誘導5mTを有する例6からの分散液10mlを、アニストレプラーゼ(anistreplase)30mgと混合し、室温において20分間静置する。こうして得た生成物は、血栓溶解用の磁気目標投薬に用いることができる。

例6に従って作った反応性超常磁性粒子はまた、例8において記載するように、腫瘍治療の磁気目標投薬用の物質の生成にも好適である。

例 8

磁気飽和誘導5mTの例6による分散液10mlを、10重量%のミトマイシンC10mlと混合し、室温下で30分間震とうする。得られた生成物は、白血病に対する磁気目標投薬に好適である。

例 9

磁気飽和誘導5mTの例6の分散液10mlを、エピルビシン塩酸塩10mgと混合し、室温において20分間震とうする。得ら

れた生成物は、腫瘍治療における磁気目標投薬に好適である。

ホスフェイトまたはホスホネート基含有薬もまた、本発明による超常磁性粒子の表面に直接に化学的に結合させることができる。これは、加えようとする安定剤の量の0.2ないし0.3倍の量が薬の形で不安定の沈殿物に加えられ、対応する残りの量の安定剤が5分間の攪拌後、連続攪拌をもって加えられる。

例 10

例1により得たマグネタイト沈殿物のすべてを、250mlの蒸留水中10gのエストラムスチンの溶液と混合し、5分間攪拌する。次いで、ジー[ω-メトキシポリエチレングリコール]-ホスフェイト(分子量約750)40gを、混

合液に加え、5分間攪拌する。得られた分散液は、磁束密度0.1 mTの永久磁石の上で30分間沈積し、上澄み材料は磁性流体から吸引する。永久磁石上の沈積物は超常磁性粒子を含み、これを0.45 μ mのフィルタを通して濾別する。得られた生成物は、前立腺の癌への磁気目標投薬に用いられる。

例 1 1

例1のマグネタイト沈殿物のすべてを、混合比約8:1:1、平均分子量約750のモノー[ω -メトキシポリエチレングリコール]-ホスフェイト、-ジホスフェイト、-ポリホスフェイトの混合物40 gを蒸留水500 mlに溶解した溶液に導入し、5分間攪拌する。こうして得られた分散液を、磁束密度0.1 Tの永久磁石の上で30分間沈積する。上澄み材料は磁性流体から吸引して出す。磁界上の沈積物は、超常磁性粒子を包含している。

超常磁性粒子は、蒸留水の洗浄を数回行い、磁界での沈積を繰り返すことにより、純粋な形でしかも粒径分布が揃った形で得ることができる。超常磁性粒子は平均流径120 nmである。

この超常磁性粒子は、腫瘍での磁気集中に非常に好適である。超常磁性粒子は、磁気機械的免疫刺激により、またはこれに加えて高体温すなわち電磁線の照射及び腫瘍の加熱により、腫瘍を破壊することができる。この超常磁性粒子は、MRI用の経口または静脈注射のコントラスト剤として用いることができる。

超常磁性粒子は、安定剤混合物を用いることにより、特定の選択されたpH値で凝集され得る。このようにして、アルカリ性腫瘍内の超常磁性粒子の沈積が、例えばコカルボキシアーゼ、モノー及びジ- ω -メトキシポリエチレングリコール]-ホスフェイトの混合物を安定剤として用いて、磁気目標投薬による集中に加えて、腫瘍の磁気機械的破壊に導かせることができる。

例 1 2

例1のマグネタイト沈積物を、蒸留水500 ml中、モノー[メトキシポリエチレングリコール]-ホスフェイト(分子量約2000)15 g、ジ- ω -メトキシポリエチレングリコール]-ホスフェイト(分子量約2000)15 g、及びコカルボキシアーゼ12 gの溶液内に導入し、超音波により5分間分散させ

る。この結果得られた分散液は、磁束密度0.1 Tの永久磁石上で沈積させ、上澄み材料は磁界から吸引して出す。磁界上の沈積物は、超常磁性粒子を含んでいる。この超常磁性粒子は、蒸留水で数回洗浄し、磁界内で沈降を繰り返して純粋な形で近接した粒径分布

のものとして得られる。この超常磁性粒子は、平均粒径120 nmである。

この超常磁性粒子は、腫瘍内への磁気集中に非常に好適である。超常磁性粒子は、磁気機械的免疫刺激、またはこれに加えて高体温すなわち電磁線照射及び腫瘍の加熱により、腫瘍を破壊する。磁界は免疫刺激の有効性を増大させることができる。

本発明による新規なジホスフェイトー及びポリホスフェイト含有安定剤物質は、単独で、すなわち超常磁性の凝集体に結合させることなく、体に全身的に投与して腫瘍を破壊するのに用いることができる。上述の安定剤物質のひとつまたはそれ以上と薬理的に受け入れることができるキャリア、例えば生理食塩水の混合物をこの目的に用いることができる。

例 13

モノー[ω-メトキシ-ポリエチレングリコール]-ジホスフェイト(分子量約1000) 4 gを生理的食塩水100 mlに溶解し、0.2 μmのフィルタを介して無菌濾別する。得られた流体は、腫瘍の破壊に用いるに好適である。

例 14

例1で得られたマグネタイト沈積物のすべてを、蒸留水500 ml中に40%ケイ酸ナトリウム溶液50 gを入れた溶液中に導入し、5分間攪拌する。この結果得られた分散液を、磁束密度0.1 Tの永久磁石上で30分間沈積し、上澄み材料を磁性流体から吸引して除去する。磁界内の沈積物は超常磁性粒子である。この超常磁性粒子は、蒸留水で数回洗浄し、磁界内で沈降を繰り返し

て純粋な形で近接した粒径分布のものとして得られる。この超常磁性粒子は、平均粒径120 nmである。

この超常磁性粒子は、腫瘍内への磁気集中に非常に好適である。超常磁性粒子

は、磁気機械的免疫刺激、またはこれに加えて高体温すなわち電磁線照射及び腫瘍の加熱により、腫瘍を破壊する。超常磁性粒子はまた、MRI用の経口または静脈注射のコントラスト剤として用いることができる。

例 15

例2で得た $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 沈積物のすべてを、蒸留水500mlに3-メルカプトプロピルトリメトキシシラン20gの溶液内に導入し、出力100Wの超音波により5分間分散させる。

このようにして得た超常磁性粒子は、直径310nmである。分散液は、蒸留水に対して透析され、0.45 μm のフィルタを通して濾別する。得られた生成物は、モノクロナール抗体の結合用に用いることができる。

例 16

例1で得たマグネタイト沈積物のすべてを、水500ml中の ω -メトキシポリエチレングリコールトリメトキシシラン（分子量1000）40gの溶液中に導入し、70℃に加熱しながら超音波発生器（出力100W）により10分間分散させる。安定な磁性流体を形成する非凝集または僅かに凝集したのみの超常磁性単ドメイン粒子の分離は、例4に示した磁気沈降により行わせる。

反磁性ポリアルキレン基含有薬理活性物質もまた、吸着によりポ

リアルキレングリコール基含有超常磁性粒子に結合させることができる。これらの物質は、非均質磁界の影響の下、磁気目標投薬中超常磁性粒子の表面から再び離脱される。例えばドキシソルブシンモノポリエチレングリコールホスフェイトを、例5に従って粒子上に吸着により結合させるとすると、この生成物は、腫瘍の治療における細胞分裂抑制剤の磁気目標投薬に用いることができる。

例 17

例1により得たマグネタイト沈積物のすべてを、蒸留水500ml中の ω -オキソエトキシポリエチレングリコールシラントリオール（分子量約1800）45gの溶液中に導入し、超音波発生器（出力100W）により5分間分散させる。このようにして得た分散液を50kDのフィルタを介して水に対して透析し、過量分の安定剤物質を除去する。

安定な磁性流体を形成する非凝集または僅かに凝集したのみの超常磁性単一ドメイン粒子の分離は、例4に示した磁気沈降により行わせる。この超常磁性粒子は、180nmの平均粒径を有する。

この例に従って生成した超常磁性粒子は、アルデヒド基の反応性を適用できる多くの結合反応に用いることができる。このようにして、例えばストレプトキナーゼまたはプラスミノーケーン-ストレプトキナーゼアクチベータ錯体のようなアミノ基含有薬理活性物質の結合に用いることができる。

例 18

5mTの磁気飽和誘導を有する例17で得た分散液10mlをアニストレプラーゼ(anistreplase)30mgと混合し、室温において

20分間放置する。この結果得られた生成物は、血栓溶解のための磁気目標投与に好適である。

例 19

5mTの磁気飽和誘導を有する例17で得た分散液10mlを、10mgドキソルビシン含有溶液10mlと混合し、室温において30分間震とうする。この結果得られた生成物は、腫瘍治療における磁気目標投与に用いることができる。

この超常磁性粒子は、腫瘍への磁気集中に好適であり、腫瘍破壊細胞分裂抑制剤は、より高い濃度で腫瘍に作用する。腫瘍破壊は、これに加えて、高体温、例えば電磁線の照射により、及び腫瘍の加熱によっても果たされるのである。

磁場は、免疫刺激の有効性を増大する。

例 20

例1で得たマグネタイト沈積物のすべてを、水500ml中のケイ酸ナトリウム70%、アルミン酸ナトリウム30%の混合物25gの溶液中に導入し、70℃に加熱しながら超音波発生器(出力100W)により10分間分散させる。この分散液を希塩酸で中和してpH7とした後、安定な磁性流体を形成する非凝集または僅かに凝集したのみの超常磁性単一ドメイン粒子は、例4に示した磁気沈降により分離される。この超常磁性粒子は、胃腸領域の経口コントラスト剤として用いることができる。

例 2 1

例 1 で得たマグネタイト沈積物のすべてを、水 500 ml 中のデキストラン・スルフェイトのナトリウム塩 20 g の溶液中に導入し、

70℃に加熱しながら超音波発生器（出力 100 W）により 10 分間分散させ、安定な磁性流体を形成する非凝集または僅かに凝集したのみの超常磁性単ドメイン粒子は、例 4 に示した磁気沈降により分離される。この超常磁性粒子は、胃腸領域の経口コントラスト剤として用いることができる。

超常磁性粒子は、これが表面活性剤と結合した時、細胞膜も破壊することができる。このため生体外及び生体内において細胞を破壊することができる。好適な表面活性剤の例としては、ノニルフェノール・ポリエチレングリコール・ホスフェイト、アルキルまたはアルキルアリル・ポリエチレングリコール・スルフェイト（エチレンオキシド基の数 5 ないし 40）があげられる。

体の中で磁気機械的な免疫刺激を開始させるには、磁化可能な白血球を体の中に非経口的に投与し、磁界により活性部位に集中させる。磁気機械的な力により、磁化された白血球、及びここではことに好中球顆粒球及びマクロファージが、高内皮ベノール（endothelial venols）内に集中し、加速された状態で内皮に浸透して、組織に浸透する。磁化可能な白血球の集中、例えば腫瘍組織内への集中は、その免疫学的な破壊を導く。ことに、超常磁性粒子による腫瘍細胞膜の磁気機械的な破壊が生じた時、腫瘍細胞膜の断片が隣接する好中球顆粒球により捕食される。腫瘍抗体の形成はまた、未治療腫瘍の破壊につながる。磁界は、免疫刺激の有効性を増大することができる。

磁化可能な白血球の集中を生じさせるために、白血球濃縮物を反応性超常磁性粒子に混合し、室温または 37℃において反応させ

る。

例 2 2

白血球濃縮物 100 ml を例 6 の分散液 10 ml と混合し、磁気飽和誘導 5 mT と混合した後、37℃において 20 分間静置する。このようにして得た生成物

は、腫瘍破壊のための磁気目標投与に用いることができる。

磁気機械的免疫刺激はまた、例えば磁化可能なウイルス、バクテリア、菌類、腫瘍細胞またはそれらの磁化可能な表面分子によっても実行できる。基か可能なウイルス、細胞またはそれらの表面分子は、これらが網内系によって認識され、マクロファージ及び好中球顆粒球によって結合されて捕食される。この捕食の結果、表面分子の一部は、主組織適合性錯体からグリコプロテインに同様に再使用される錯体としてマクロファージの表面に戻されて、ここで免疫系のT-リンパ球によりチェックされ、抗体として認識されて、表面分子に対する適当な免疫応答が活性化される。従って、対応するウイルス及び細胞に対する体の免疫の活性化が生ずるのである。磁界はこの免疫刺激の有効性を増大させる。

このようにして、治療が困難なウイルス感染、バクテリア感染、または菌類感染の免疫及び治療が可能となる。

磁化可能なウイルスまたは細胞は、例えば例6に従って反応性超常磁性粒子を単に混合するだけで作り出される。ウイルス及び細胞に対して免疫を増大するための薬理活性剤は、磁化可能な混合物に薬理的に受け入れることができるキャリアを加えることにより得られる。

ウイルス、バクテリア、または腫瘍細胞の磁化可能な表面分子は、これらの生体片に反応性超常磁性粒子片を単に混合し、次いで生理的適応物質により残りの反応性基をブロックすることにより生成される。このようにして、例えば、例6による安定剤物質の過量のアルデヒド基は、生体片分散液に0.5モルのエタノールアミン-塩酸塩溶液(pH 8.5)を加えることによりブロックされる。磁化した表面分子は、例えば圧力消化、機械的摩砕、浸透衝撃処理などの既知の消化プロセスにより磁化された生体片を破壊した後、磁界により消化分散液から取り出される。磁化可能な表面分子は、数回水洗いし、磁界により分離して、精製される。ウイルス及び細胞に対する免疫を増大させるための薬理活性調剤は、この精製した磁化可能な表面分子に薬理的に受け入れることができるキャリアを加えることで得られる。

ウイルス、バクテリア、腫瘍細胞及びそれらの表面分子が生体外で磁化される

のにつれ、患者に特定の免疫処置も実行することができる。これは、対応するウイルス及び患者の体から採った細胞の隔離または集中次第のことである。

超常磁性粒子は、表面活性剤と結合すると、細胞膜をも破壊することででき、このため生体外でも生体内でも細胞破壊をもたらすことができる。好適な表面活性剤としては、例えばノニルフェノールポリエチレングリコールホスフェイト、アルキルまたはアルキルアリールポリエチレングリコールスルフェイト（エチレンオキシド基の数5ないし40）があげられる。

本発明による超常磁性粒子の主要な用途は、磁気目標投薬の分野

である。磁性材料の含有量が非常に多い（90ないし98重量%）ので、小さな磁性粒子でも、電磁石または永久磁石によって体の特定の領域に非常によく、かつ非常に急速に集中させることができる。薬理活性物質が、この超常磁性粒子に結合されると、活性部位におけるその濃度は劇的に増大する。この事実、腫瘍の化学療法に用いられる物質は、体の器官全体に非常に強い副作用を与えるが、この物質が活性部位において富化されると、残りの体の部分は細胞分裂抑制剤によって著しく影響されないから、癌の治療のために特に重要である。

超常磁性粒子は、ウイルス、細胞、及びそれらの表面分子との結合による体内の免疫活性化に用いることができる。磁界の効果は、この免疫活性化を助成する。

反応性超常磁性粒子はまた、対応する診断物質がこの粒子の表面に化学的に結合するならば、生体外での診断に用いることができる。磁界との磁気相互作用が著しいので、非常に小さな超常磁性粒子でも、診断反応が生じた後、再び反応混合物から取り出すことが容易である。

この超常磁性粒子はまた、核スピン診断のためのコントラスト剤として用いることができる。

超常磁性粒子の量は、磁気飽和誘導を約5 mTとすると、MRIのためのコントラスト剤として用いる時、血液量の約0.001容量%である。

【手続補正書】特許法第 184 条の 8

【提出日】1994 年 10 月 13 日

【補正内容】

これらの超常磁性粒子の水性分散液内での沈積を妨げるために、吸着により粒子表面にそれ自体で付着する安定剤物質を添加する。このような粒子は、US-A-3,215,572, US-A-3,531,413, US-A-3,917,538, W085/02772, US-A-4,101,435 及び US-A-4,452,773, SE-A-8307060-7 に記載されている。

吸着安定化磁性粒子は、生理学的な条件下では安定でない。これは、安定剤物質が釈放されるので容易に凝集するからである。特定の組織に対する結合親和性または薬理的な活性を有する物質が吸着安定化磁気粒子に結合されるならば、安定剤物質、従って結合親和性及び薬理活性を備えた物質は、磁気粒子から釈放され、この磁気粒子は結合部位に達しないか、或いは薬理活性物質が磁気目標投薬中に作用部位において濃厚化されないという危険がある。

生物分解を起こすことが可能な超常磁性金属酸化物結晶は、W090/01889 に公知である。この文献には、各個の超常磁性結晶が、多官能性の物質の添加により多官能性の物質との凝集体を形成する。このような凝集体の生成は、W088/00060 に記載された方法に対応している。この方法によれば、鉄酸化物粒子は、基本媒体中に例えば多糖類（ポリサッカリド）、蛋白質（プロテイン）などの多官能性物質を付加的に包含する溶液から沈殿させて、例えばポリサッカリド被覆超常磁性鉄酸化物粒子を形成させ、次いでこれを透析し、最後に遠心分離する。この沈殿した粒子は凝集される。

W090/01295 は、超常磁性金属酸化物から成る MR コントラスト

剤に関し、この超常磁性金属酸化物は、W088/00060 に記載された方法と同様な方法により作られた他の重合物質との高分子化合物ないしは配合体に関連している。

胃腸領域の生体内 MR イメージを得る方法が US-A-5069216 に記載されている。この方法では、W090/01295 または W088/00060 に記載されたようにして得た超常磁性凝集物が使用されている。EP-A-125995 は、磁性金属酸化物のコアを有する磁

性粒子に関する。この磁性金属酸化物コアは、シラン被覆を有し、これに分子が等価的に結合することができる。

Roch, A. et al は、Magma1 (1993) 83-88 に、例えばデキストランを鉄塩溶液に加えることによる通常のやり方で生成させた凝集物からなる超常磁性コントラスト剤を記載している。

EP-A-516252 には、化学吸着で吸収したグリコサミノグリカン被覆を有する微結晶磁性粒子が記載されている。グリコサミノグリカンは、超音波処理をすることなく、環境温度における中性範囲の生体模倣の合成を介して鉄塩から得たものである。

EP-A-0284549 においては、安定剤物質はホスフェイト基またはホスホネート基を包含し、これにより安定剤物質は、超常磁性粒子の表面に化学的に結合される。この安定剤物質がなお、化学的に反応性のある基を包含すると、薬理活性物質を結合することができる。これらの化学的に安定化した超常磁性粒子は、水性分散液中で沈殿せず、僅かに 0.003 ないし $0.01 \mu\text{m}$ の粒径を有するのみである。非経口投薬中に安定剤物質を釈放することがない。すなわち、血液中での凝集や沈積がなく、従って器官内で

の分布が良好である。

これらの磁性粒子は磁性薬目標投与のためには余りにも小さく、身体の特定期域において磁性粒子を濃厚化するためには、非常に

大きな磁界勾配を用いなければならない。

小さな $0.01 \mu\text{m}$ の超常磁性粒子を、多孔質ポリマー粒子 (SE-A-7706431)、ポリグルタルアルデヒドポリマー (US-A-4,267,234)、シランポリマー (US-A-4,554,088)、アルブミン濃縮ポリマー (US-A-4,675,173) またはセルローズエステル (Ito, R. et al., Int. J. Pharm., 61, 109, 1990) 内にカプセル化することにより、より大きな超常磁性粒子を作ることができる。この粒子の径は、 0.05 ないし $100 \mu\text{m}$ の範囲である。アルブミン濃縮ポリマー及びセルローズエステル以外の使用されるすべての重合薬品は、生理的に有害であり、しかも体の中で

の磁性粒子の溶解率は非常にゆっくりである。上述のすべての大きな超常磁性粒子は、地球の重力場において沈積し、従って使用に先立って再分散させなければならない。

ポリマー粒子の鉄酸化物成分は、重量比にして10ないし最高50%、容量比にして最高10%の範囲である。磁性粒子が少ないほど、体の特定の領域においてこの磁性粒子を集中させるためには磁気目標投薬時に必要とされる磁界勾配は高くなる。磁性粒子の粒径が大きいほど、これらの磁性粒子は網内皮系によって結合される。すなわち生体適合性が減少し、結合された薬理的活性物質の量が減少する。それ故、磁気目標投薬のための最適磁性粒子をできるだけ小さくし、薬理的活性物質の量を可能な限り多くし、磁性材料の量を可能な限り最大限とし、この磁性材料の透磁率を可能な限り最大限とし、体内における溶解率を可能な限り最大限として、適度の生

体適合性を有するようにしなければならない。

請求の範囲1に特定された本発明の目的は、冒頭に述べた欠点を回避し、さらに新たな適用領域、ことに腫瘍の破壊及び免疫の増強という適用領域を開くために、新規な化合物及び超常磁性粒子を作り出すことにある。

本発明によれば、非常に小さな超常磁性の単一ドメイン粒子は凝集されるが、この超常磁性粒子の表面上の反応性安定剤物質の化学的結合により、さらなる凝集からは保護されることで、上述の目的が達成される。この新規の超常磁性凝集体は、その反応性安定剤物質とともに、本発明における活性物質となる。

生物分解性を高く、毒性を可能な限り低く保つために超常磁性単一ドメイン粒子を可能な限り小さく作ることが有利である。この超常磁性単一ドメイン粒子は粒径が0.001ないし0.02ミクロンの範囲、好適には0.003ないし0.01ミクロンの範囲である。

従来技術とは対照的に、この単一ドメイン粒子の凝集がまず起こり、次いでこの凝集体の表面への安定剤物質の結合が起こり、凝集体の他の特性が生ずるのである。

従って、単一ドメイン粒子と安定剤物質とからなる本発明による超常磁性粒子

は、鉄酸化物、鉄混合酸化物、または3ないし20ナノメートルの範囲の粒径を有する鉄が合同して、磁界中で定まった行動を呈する、粒径10ないし1000ナノメートルの安定で分解可能な凝集体を形成し、この凝集体がその表面上に、ホスフェイト、ジホスフェイト、カルボキシレート、ポリホスフェ

イト、チオホスフェイト、ホスホネート、チオホスホネート、スルフェイト、スルホネート、メルカプト、シラントリオール、トリアルコキシシラン基含有ポリアルキレングリコール、カルボキシヒドレートまたはホスフェイト基含有ヌクレオチド、更なる結合部位を有することができるそのオリゴマーまたはそのポリマーを包含する群から選んだ安定剤物質からなる単原子層を有することを特徴とする。

生物的分解性を高く、毒性をできるだけ少なく保つために、超常磁性単ドメイン粒子をできるだけ小さく作ることが好都合である。この超常磁性単ドメイン粒子は、0.001ないし0.02 μm の範囲の直径、好適には、0.003ないし0.01 μm の直径である。

$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 、 Fe_3O_4 及びFeが、生体内投与用の生理的適合性のある物質として使用される。さらに毒性のある磁性材料も生体外の適用として使用できる。例えば、一般式 $\text{MO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ に対応する鉄混合酸化物、ここでMは、Fe、Mg、Be、Mn、Zn、Co、Ba、Sr、Cuまたはその混合物のような2価の金属イオン、または一般式 $m\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot n\text{Me}_2\text{O}_3$ 、ここでMeはAl、Cr、希土類金属またはその混合物のような3価の金属イオン、があげられる。

本発明によれば、超常磁性単ドメイン粒子は、pH、温度及び

請求の範囲

1. 単ドメイン粒子と安定剤物質とから成る超常磁性粒子において、鉄酸化物、鉄混合酸化物、または3ないし20ナノメートルの範囲の粒径を有する鉄からなる超常磁性単ドメイン粒子が合同して、磁界中で定まった行動を呈する、粒径10ないし1000ナノメートルの安定で分解可能な凝集体を形成し、この凝集体がその表面上に、ホスフェイト、ジホスフェイト、カルボキシレート、ポ

リホスフェイト、チオホスフェイト、ホスホネート、チオホスホネート、スルフェイト、スルホネート、メルカプト、シラントリオール、トリアルコキシシラン基含有ポリアルキレングリコール、カルボキシヒドレートまたはホスフェイト基含有ヌクレオチド、更なる結合部位を有することができるそのオリゴマーまたはそのポリマーを包含する群から選んだ安定剤物質からなる単原子層を有することを特徴とする超常磁性粒子。

2. 請求の範囲 1 記載の超常磁性粒子において、前記超常磁性単一ドメイン粒子の粒径が 3 ないし 20 nm の範囲であり、前記超常磁性凝集体の粒径が 10 ないし 1000 nm の範囲であることを特徴とする超常磁性粒子。

3. 請求の範囲 1 または 2 記載の超常磁性粒子において、前記超常磁性単一ドメイン粒子が、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 、 Fe_3O_4 及び一般式 $\text{MO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ に対応する鉄混合酸化物、ここで M は、2 価の金属イオン Fe、Mg、Be、Mn、Zn、Co、Ba、Sr、Cu またはその混合物、または一般式 $m\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot n\text{Me}_2\text{O}_3$ に対応す

る混合酸化物、ここで Me は、3 価の金属イオン Al、Cr、希土類金属またはその混合物、または鉄からなることを特徴とする超常磁性粒子。

4. 請求の範囲 1 ないし 3 のいずれかに記載の超常磁性粒子において、前記安定剤物質が、次に記載する物質から選んだことを特徴とする超常磁性粒子。

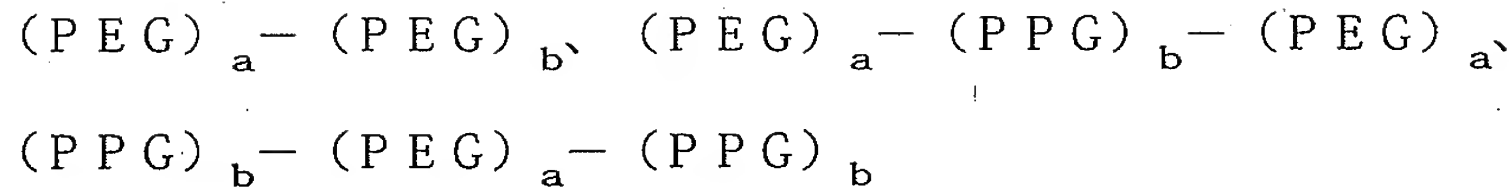
(i) 一般式 $\text{X}-\text{R}-\text{A}-\text{B}$ に対応する化合物

ここで、X は、アルキル部分の炭素原子が 1 ないし 4 の範囲の数であるアルコキシ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリアルキルアミノ及びアルキルチオ基から選んだ官能基、またはヒドロキシ、アミン、アルデヒド、ジメチルアセタール、ジエチルアセタール、エポキシ、チオール、カルボキシ、4, 6-ジクロロトリアジン、ヒドロキサム酸、イソシアネート、アシルアジド、酸無水物、ジアゾニウム塩、イミノカルボネート、及びトルエンスルホネート基から選んだ官能基、

R は欠除か、または

R は、ポリアルキレングリコール、水混和性ポリプロピレングリコール基また

は、



ブロック共重合体から選んだポリエチレングリコール (PEG) 及びポリプロピレングリコール (PPG) の水混和性ブロック共重合体基、

ここで、a は 1 から 100 までの範囲の正の整数、b は 1 から 20 までの範囲の正の整数；

n は、PEG については 4 から 300 までの範囲から選んだ正の整数、PPG については 3 から 12 までの範囲から選んだ正の整数、PEG-PPG ブロック共重合体については 3 から 140 までの範囲から選んだ正の整数；または

R は、モノサッカリドグルコース、フルクトース、リボース、デスオキシリボース、イノシトールから、またオリゴサッカリドサッカロース、ラフィノース、ゲンチアノース、マレシトース、スタキオース、パーパスコースから、ポリサッカリドスターチ、リケニン、グリゴーケン、デキストリン、デキストラン、イヌリン、フルクトサン、ラパン、マンナン、ガラクタン、キシラン、アラパン、ペクチン、マクロポリサッカリド、グリコプロテインから、ポリウリデニル酸、ポリグルクロン酸、ポリガラクツロン酸、ポリマンヌロン酸、及び/またはアルギン酸から選んだ炭水化物基であり、

A は、欠除か、または

A は、アルキル、アルコキシ、アシル、アシルアミン、アルキルアミン基、ここでアルコキシ、アシル、アシルアミン、アルキル基の炭素原子数は 1 ないし 4 の範囲；

であり、

B は、モノホスフェイト、ジホスフェイト、ポリホスフェイト、ホスホネート、チオホスフェイト、チオホスホネートから選んだリン含有基、またはカルボキシレート、スルフェート、スル

ホネート、メルカプト、シラントリオールまたはトリアルコキシシラン含

有基であり、

(ii) ホスフェイト基含有ヌクレオチド モノー、シー、トリリン酸エステル、またはアデノシン、グアノシン、キチジン、ウリジン、シミデン、デソキシアデノシン、デソキシグアノシン、デソキシシチデン、デソキシシミデン、イノシン、ピリミデン、シトシン、ウラシル、シミン、プリン、アデニン、グアニン、メチルキトシン、5-ヒドロキシメチルーキトシン、2-メチルアデニン、1-メチルグアニン、チアミン、フラビン、リボフラビン及びピリドキサールホスフェイト、ピリドキサミンホスフェート、リボ核酸、リボ核酸シーケンス、デソキシリボ核酸、デソキシリボ核酸シーケンスのモノー、シー、トリリン酸エステルクロライド、

(iii) オルトケイ酸のケイ酸塩基含有化合物及びその縮合生成物、及び／または、

(iv) $X-R-A-B$ が、メルカプトプリン、メルカプトシトシン、メルカプトグアニン、メルカプトウラシル、メルカプトシミン、メルカプトヒポキサンシン、及びそのメルカプトヌクレオシド及びそのメルカプトデソキシヌクレオシドで、

(v) $X-R-A-B$ がポリアミノカルボヒドレートである。

5. 請求の範囲1ないし4のいずれかに記載の超常磁性粒子において、

(i) 抗原、抗体、リボ核酸、デソキシリボ核酸、リボ核酸シーケンス、デソキシリボ核酸シーケンス、ハプテン、プロテイ

ンA、プロテインG、エンドトキシン結合プロテイン、レクチン、セレクチンを包含する群から選んだ組織特定結合物質、

(ii) 抗腫瘍プロテイン、酵素、抗腫瘍酵素、抗生物質、植物性アルカロイド、アルキル化剤、代謝阻害剤、ホルモン、ホルモンアンタゴニスト、インターロイキン、インターフェロン、成長因子、腫瘍ネクロシス因子、エンドトキシン、リンホトキシン、ウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ、プラスミノージェンーストレプトキナーゼーアクチベータ錯体、組織プラスミノージェンーアクチベータ、デスモーズスープラスミノージェンーアクチベータ、マクロファージーアクチベータ

タ体、アンチセラ、プロテアーゼインヒビタ、及び/または放射性リン³²P含有安定剤物質、表面活性剤を包含する群から選んだ薬理活性物質、

(iii) 細胞器官、ウイルス、細菌、藻類、菌類、ことに赤血球、血小板、顆粒白血球、単核白血球、リンパ球、及び/またはランゲルハンス島を包含する群から選んだ薬理活性細胞、

(iv) ポリカルボキシル酸、アミノカルボキシル酸、ポルフィリン、カテクラミンを包含する群から選んだ薬理活性錯体、

(v) ホスフェイトまたホスホネート基含有薬、及び/または

(vi) 細胞融合促進物質、

が化学的に結合されていることを特徴とする超常磁性粒子。

6. 単ドメイン粒子及び安定剤物質からなる超常磁性粒子の製法において、超常磁性単ドメイン粒子が、鉄塩溶液をpHが8.0から10.0の範囲のアルカリ液またはアンモニア性液を

加えて沈殿させることにより、鉄酸化物、鉄混合酸化物、または粒径3ないし20の範囲の鉄により形成し、これに酸を加えてpH3ないし7に調整し、50ないし120℃の範囲の温度、場合によってはこのpH及びこの温度範囲で圧力を高めて凝集させ、公知の方法により精製し、ホスフェイト、シホスフェイト、カルボキシレート、ポリホスフェイト、チオホスフェイト、ホスホネート、チオホスホネート、スルフェイト、スルホネート、メルカプト、シラントリオール、トリアルコキシシラン基含有ポリアルキレングリコール、カルボヒドレート、またはホスフェイト基含有ヌクレオチド、さらなる結合部位を有することができるそのオリゴマーまたはポリマーを包含する群から選んだ前記安定剤物質の20ないし50重量%と反応させ、定まった作用を有する前記安定な分解可能な凝集体を磁界の中で公知の方法で精製し、場合によっては公知の方法で薬理的にまたは診断的に活性の物質と結合させることを特徴とする製法。

7. 薬理的に受け入れられるキャリアと、鉄酸化物、鉄混合酸化物、または粒径3ないし20ナノメートルの鉄の超常磁性単ドメイン粒子からなる超常磁性粒子とからなる薬理活性調剤であって、前記超常磁性粒子が合同して、磁界の下

で定まった作用を呈する粒径10ないし1000ナノメートルの粒径の安定した分解可能な凝集体を形成し、この凝集体が、ホスフェイト、シホスフェイト、カルボキシレート、ポリホスフェイト、チオホスフェイト、ホスホネート、チオホスホネート、スルフェイト、スルホネート、メルカプト、シラントリオール、トリアルコキシシラン基含有ポ

リアルキレングリコール、カルボヒドレート、またはホスフェイト基含有ヌクレオチド、さらなる結合部位を有することができるそのオリゴマーまたはポリマーを包含する群から選んだ安定剤物質からなる単原子層を表面に有し、場合によっては、組織特定結合物質と、薬理活性物質と、薬理活性細胞と、薬理活性錯体形成剤と、請求の範囲5記載の群から選んだ薬剤または細胞融合促進物質とを有する薬理活性調剤。

8. 腫瘍の破壊、免疫の増強、場合によっては磁界の影響下においてのこれらのことのための請求の範囲7記載の薬理活性調剤の用途。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/DE 94/00314
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 5 A61K9/50 A61K49/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 5 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,90 01899 (ADVANCED MAGNETICS) 8 March 1990 see abstract see page 6, line 1 - line 34 see page 10, line 29 - page 11, line 23 see page 12, line 27 - page 13, line 24 see page 17, line 10 - line 27 see page 20, line 17 - page 21, line 3; claims ---	1-4, 6
X	WO,A,90 01295 (ADVANCED MAGNETICS) 22 February 1990 see abstract see page 11, line 23 - line 34 see page 20, line 6 - page 21, line 35 see page 31, line 17 - page 33, line 22; claims --- -/--	1-7
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
12 August 1994		23. 08. 94
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Hoff, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/DE 94/00314

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,88 00060 (ADVANCED MAGNETICS) 14 January 1988 see abstract; claims ----	1-7
X	US,A,5 069 216 (GROMAN ET AL.) 3 December 1991 see column 6, line 10 - line 54 see column 7, line 57 - column 8, line 21 see column 9, line 40 - line 50 see column 17, line 37 - column 18, line 10; claims ----	1-7
A	EP,A,0 284 549 (SILICA GEL) 28 September 1988 cited in the application see the whole document ----	1-8
A	EP,A,0 125 995 (ADVANCED MAGNETICS) 21 November 1984 cited in the application & US,A,4 554 088 (CHAGNON ET AL.) 19 November 1985 see abstract; claims ----	1-8
A	MAGMA, vol.1, no.2, 1993 pages 83 - 88 A ROCH ET AL. 'IN VITRO RELAXOMETRIC CHARACTERIZATION OF SUPERPARAMAGNETIC CONTRAST AGENTS' see the whole document ----	1-8
A	EP,A,0 516 252 (INSTITUT FÜR DIAGNOSTIKFORSCHUNG) 2 December 1992 see abstract; claims -----	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE 94/00314

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Remark: Although the claim 8 refer to a process for treatment of the human/animal body, the search was carried out and based on the indicated effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐
☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/DE 94/00314

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9001899	08-03-90	US-A- 5055288 EP-A- 0441797 US-A- 5314679	08-10-91 21-08-91 24-05-94
WO-A-9001295	22-02-90	EP-A- 0381742 JP-T- 4501218 US-A- 5141739 US-A- 5262176 US-A- 5284646	16-08-90 05-03-92 25-08-92 16-11-93 08-02-94
WO-A-8800060	14-01-88	US-A- 4827945 US-A- 4770183 CA-A- 1301063 EP-A- 0275285 JP-T- 1500196 US-A- 5055288 US-A- 5141739 US-A- 5262176 US-A- 5284646 US-A- 5248492 US-A- 5219554 US-A- 5314679 US-A- 4951675 US-A- 5069216 US-A- 5102652	09-05-89 13-09-88 19-05-92 27-07-88 26-01-89 08-10-91 25-08-92 16-11-93 08-02-94 28-09-93 15-06-93 24-05-94 28-08-90 03-12-91 07-04-92
US-A-5069216	03-12-91	US-A- 4951675 US-A- 4770183 US-A- 5248492 US-A- 5219554 CA-A- 1301063 EP-A- 0275285 JP-T- 1500196 US-A- 4827945 WO-A- 8800060 US-A- 5102652 US-A- 5141739 US-A- 5262176 US-A- 5284646 US-A- 5314679	28-08-90 13-09-88 28-09-93 15-06-93 19-05-92 27-07-88 26-01-89 09-05-89 14-01-88 07-04-92 25-08-92 16-11-93 08-02-94 24-05-94

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International	Application No
PCT/DE	94/00314

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
EP-A-0284549	28-09-88	DE-A-	3709851	06-10-88
		DE-T-	3872741	20-08-92
		ES-T-	2052766	16-07-94
		JP-A-	63255237	21-10-88
		US-A-	5160725	03-11-92

EP-A-0125995	21-11-84	US-A-	4554088	19-11-85
		CA-A, C	1254028	16-05-89
		DE-A-	3485332	23-01-92
		EP-A-	0357593	14-03-90
		JP-A-	60001564	07-01-85
		WO-A-	8806632	07-09-88
		US-A-	4628037	09-12-86
		US-A-	4695392	22-09-87
		US-A-	4695393	22-09-87
		US-A-	4698302	06-10-87
		US-A-	4672040	09-06-87

US-A-4554088	19-11-85	CA-A, C	1254028	16-05-89
		DE-A-	3485332	23-01-92
		EP-A, B	0125995	21-11-84
		EP-A-	0357593	14-03-90
		JP-A-	60001564	07-01-85
		WO-A-	8806632	07-09-88
		US-A-	4628037	09-12-86
		US-A-	4695392	22-09-87
		US-A-	4695393	22-09-87
		US-A-	4698302	06-10-87
		US-A-	4672040	09-06-87

EP-A-0516252	02-12-92	DE-A-	4117782	03-12-92
		AU-A-	1618492	03-12-92

フロントページの続き

(51)Int. Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	
A 6 1 K 31/77		8314-4C	A 6 1 K 31/77	
35/12		7431-4C	35/12	
35/74		7431-4C	35/74	Z
35/76		7431-4C	35/76	
38/43		9284-4C	39/395	M
39/395		8825-4C	A 6 1 N 1/40	
A 6 1 N 1/40		9455-4C	A 6 1 K 37/48	
2/00		8825-4C	A 6 1 N 1/42	Z
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), JP, NO, US			